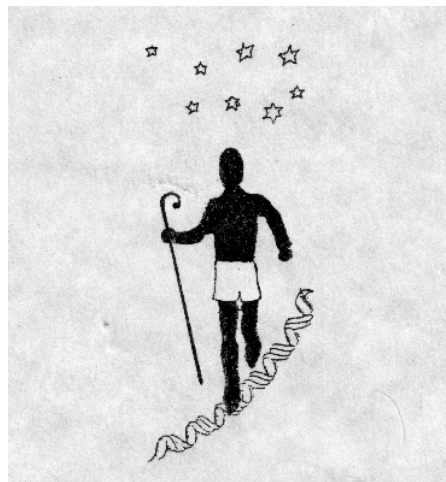


Appunti di Biologia Molecolare

Franco Gabrielli



*We used to think that our fate was in our stars.
Now we know that, in large measure,
our fate is in our genes.*

James Watson, premio Nobel per la Medicina

Figure e tabelle di questo libro sono state da me realizzate, a mano o con l'ausilio di un computer. Parte di esse sono state ridisegnate, con modifiche e aggiunte, da figure e tabelle presenti in pubblicazioni di altri autori. Nelle didascalie sono indicati i relativi riferimenti bibliografici. In caso di obiezioni, prego contattarmi all'indirizzo email riportato qui sotto.

I drew all the figures and tables in this book, either freehand or with the aid of a computer. Some of them were designed, with changes and additions, from figures and tables previously published in other books/journals. The respective references are stated in the captions. In case of any objection, please contact me at email address:

Franco Gabrielli

email: f.gabrielli@med.unipi.it

L'ordine è la prima legge del paradiso.
Alexander Pope

Indice
Pagine

V	Prefazione
VI	Prefazione alla 1a edizione
X	Cenni storici
XII	Alcune considerazioni sulla didattica della biologia molecolare
XIV	Alcune considerazioni sulla propedeutica allo studio della biochimica, biologia cellulare e biologia molecolare
XV	Considerazioni su alcuni testi di chimica, biochimica e biologia molecolare
1	Capitolo 1. Genoma umano e tecnologie del DNA
	Sequenze presenti nel genoma umano
	Alcune caratteristiche del genoma umano
	Leggi e convenzioni della biologia molecolare
	Siti, endonucleasi e mappe di restrizione
	DNA ligasi
	Ibridazione degli acidi nucleici
	Analisi Southern
	Analisi Northern e analisi Western
	Tecnologie per la sintesi del DNA (clonazione e reazione a catena della DNA polimerasi)
	Tecniche per l'analisi della sequenza nucleotidica del DNA
	Costruzione e vaglio delle genoteche
	Dalla sequenza nucleotidica del gene alla sequenza aminoacidica della proteina da esso codificata.
	Ricerca della identità del gene neoclonato mediante analisi elettronica della sua sequenza nucleotidica e della sequenza aminoacidica della proteina da esso codificata
	Ricerca della funzione e delle caratteristiche molecolari dei geni e delle proteine mediante analisi elettronica delle loro sequenze
	Genotipo, fenotipo e analisi cliniche
93	Capitolo 2. Tecnologie per ricercare la funzione dei geni
	Transfezione
	Animali transgenici
	Geni reporter
	Mutazione sito specifica del gene
	Tecnologie per l'inibizione dell'espressione di singoli geni
	Analisi dell'espressione di singoli geni
	I microarray
	Alcune considerazioni sulle tecnologie del DNA per ricercare l'attività molecolare e la funzione cellulare di una proteina
119	Capitolo 3. Tecnologie per definire la posizione cromosomica e subcromosomica dei geni
	Costruzione degli alberi genealogici

Ricerca delle aberrazioni cromosomiche associate a patologie
 Dosaggio del gene
 Analisi genetica delle cellule somatiche ibride interspecifiche
 FACS
 Ibridazione *in situ*
 Costruzione della mappa citogenetica umana
 Costruzione delle mappe genetiche
 Ricerca dei marcatori genetici
 Geni marcatori genetici
 Marcatori genetici RTLP, VNTR e SNP
 Mappe genetiche del genoma umano
 Associazione gametica preferenziale
 Mappa degli ibridi di radiazione
 Mappa dei contig dei cloni YAC
 Mappatura fisica dei geni mediante vaglio della genoteca YAC
 Mappa delle sequenze STS
 Mappa delle sequenze EST
 Importanza attuale delle sequenze EST
 Mappa della sequenza nucleotidica del DNA genomico umano
 Determinazione dell'impronta e del profilo del DNA umano

179 Capitolo 4. Strategie per la clonazione dei geni e progetto genoma umano

Strategia della clonazione funzionale dei geni
 Strategia della clonazione dei geni candidati funzionali
 Strategia della clonazione posizionale dei geni
 Camminare e saltare sul cromosoma
 Strategia della clonazione dei geni candidati posizionali
 Schemi delle strategie per la clonazione dei geni
 Identificazione del gene responsabile della suscettibilità alla patologia MODY2
 Identificazione del gene BRCA1 responsabile della suscettibilità al tumore della mammella

240 Appendici

Appendice A. Funzione del gene, attività molecolare e funzione fisiologica della proteina codificata
 Appendice B. Cenni della regolazione dell'espressione genica negli eucarioti
 Appendice C. Incremento della specificità del riconoscimento molecolare
 Appendice D. Eterogeneità genetica della specie umana
 Appendice E. Malattie genetiche umane
 Appendice F. Prioni, una nuova classe di agenti infettivi e una nuova malattia genetica

321 Bibliografia

Prefazione

Questi appunti di biologia molecolare hanno lo scopo di introdurre gli studenti alla conoscenza delle tecnologie del DNA al fine di poter meglio comprendere la grandezza dei risultati scientifici ottenuti nello studio dei geni umani e di integrare le loro conoscenze genetiche e biochimiche di base con quelle della moderna genomica.

Le tecnologie del DNA, per la loro alta versatilità e capacità di analisi e di sintesi, hanno permesso di definire, in tempi brevi, la sequenza nucleotidica di tutto il DNA genomico umano e di conoscere gli intimi meccanismi della trasmissione e dell'espressione dei caratteri genetici normali e patologici. Questi meccanismi sono, in parte o in tutto, invisibili con il solo studio del fenotipo perché condizionati dalla diploidia del genoma, dalla dominanza e recessività degli alleli, dalla ricombinazione e conversione genica, dal polimorfismo del genoma umano e dal contributo di più geni a molti caratteri normali e patologici.

Le tecnologie del DNA apparse negli anni '70 del secolo scorso si sono sviluppate moltissimo, diventando tanto intellettualmente elaborate quanto molto semplici nella esecuzione, per l'uso di macchine-robot e di prodotti commerciali consistenti in corredi di soluzioni già pronte e protocolli dettagliati di facile esecuzione (kit), che portano a sintetizzare prodotti polimerici complessi e danno risultati analitici di alto livello, impensabili pochi anni fa. Le tecnologie del DNA, data la loro alta potenzialità di analisi e sintesi, hanno causato una rivoluzione in tutte le discipline mediche e biologiche che, prima dell'avvento delle biotecnologie, erano limitate allo studio del fenotipo.

E' mia convinzione che lo studio delle tecnologie del DNA istruisca, *di per sé*, anche alla conoscenza dei meccanismi molecolari che avvengono nelle cellule, perché queste tecnologie utilizzano in larga misura le stesse molecole e macromolecole e gli stessi meccanismi molecolari utilizzati dalle cellule per le loro normali funzioni. Inoltre molte biotecnologie sono opere di ingegno di alto livello, e per questo la loro conoscenza migliora anche in senso generale l'intellettualità di chi le studia.

Franco Gabrielli

Alice venne al bivio e vide sull'albero il gatto del Cheshire.

"Che strada prendo?", chiese.

La risposta del gatto fu una domanda: "Dove vuoi andare?".

"Non so", rispose Alice.

"Allora non importa", rispose il gatto.

(da *Le avventure di Alice nel paese delle meraviglie*, 1865, Lewis Carroll)

Questo breve dialogo non è per gli studenti, almeno non per quelli che hanno deciso dove vogliono andare. Ma l'esitazione su quale strada prendere si ritrova poi a ogni passo, anche dopo aver imboccato il cammino giusto. Perché non basta superare il bivio. Occorre imparare a imparare, a creare, a comunicare, a vincere lo stress e le emozioni, a gestire il tempo, a dare fondo agli illimitati "serbatoi di riserva" della propria mente. Spero che il corso di Biologia Molecolare possa aiutare gli studenti e anche me, perché per gli studenti e i docenti "gli esami non finiscono mai".

Quanto scritto è tratto da un breve articolo apparso sul "Sole-24 Ore" alcuni anni fa; ho cambiato solo alcune parole, "i lettori del giornale" con "gli studenti". Il giornale offriva una serie di fascicoli intitolati "L'arte di apprendere" per studenti e manager.

Prefazione alla prima edizione

“E’ il miglior ordin mio l’esser confuso.”

Motto dell’Accademia degli Intrigati di Montepulciano, fondata nel 1706 per “tenere impiegata in opere virtuose la gioventù e per sfuggire all’ozio padre di tutti i vizi”.

“Il motto (omissis) si presta all’interpretazione di esaltazione della continua ricerca che non si adagia sull’appagamento della conoscenza acquisita” (da: I fasti dell’Accademia degli Intrigati dal 1706 al 1791, di Marinella Giannini e Riccardo Pizzinelli, incluso in “Teatri, Luoghi di Spettacolo e Accademie a Montepulciano e in Val di Chiana”, Editori del Grifo, Montepulciano, 1984).

L’interpretazione personale è: “L’essere confuso è il mio miglior ordine”, cioè, mi autoimpongo di pormi dove culturalmente c’è meno chiarezza, al fine di avere molta ricerca da fare per arrivare alla soluzione di ogni problema.

Questi appunti hanno, almeno nelle mie intenzioni, lo scopo di illustrare schematicamente come la biologia molecolare, con le sue potenti metodologie di purificazione (clonazione), di analisi e di sintesi abbia penetrato tutte le scienze biologiche e mediche, unificandole nella conoscenza dettagliata del programma universalmente responsabile della conservazione e dell’espressione del patrimonio genetico. Le stesse metodologie hanno permesso la manipolazione del programma genetico fino a cambiare le disposizioni che la Natura aveva selezionato e mantenuto in milioni di anni, e in questo modo è stato possibile chiarire caratteristiche del fenotipo che apparivano oscure o che erano del tutto sfuggite all’osservazione morfologica e biochimica. La manipolazione genetica ha illuminato le conoscenze precedentemente acquisite sulla struttura e funzione delle macromolecole, inserendole in un unico contesto di rapporti tra genetica e ambiente.

La novità della biologia molecolare è quella di aver aperto il “caveau” della Natura e di aver messo in mano ai ricercatori il disegno del progetto genetico, aprendo così la strada alla conoscenza dei più intimi meccanismi delle macchine biologiche, macchina umana inclusa. E molto del fascino della biologia molecolare risiede proprio nel fatto che ogni giorno che passa capiamo meglio che cosa siamo.

James Watson, premio Nobel per la scoperta della struttura del DNA, ha detto: “Eravamo abituati a pensare che il nostro destino fosse nelle nostre stelle. Ora sappiamo che, in larga misura, il nostro destino è nei nostri geni” (tradotto da TIME, Special Issue Winter 1997/98).

L’avvento delle biotecnologie (anni ‘70) ha portato a un forte rinnovamento delle scienze biologiche e mediche, aprendo un nuovo scenario. Esse hanno permesso di valutare le funzioni biologiche osservando direttamente la costituzione genetica dell’individuo e i meccanismi dell’espressione genica, invece di ipotizzarli interpretando gli aspetti strutturali e funzionali del fenotipo. I dati portati dalle biotecnologie non sono tutti in accordo con quelli ottenuti con le tecnologie biochimiche sul fenotipo. Ad esempio, nello studio del metabolismo, la funzione di un enzima, abbondantemente presente in un tipo di cellula, viene

assunta essere importante per la fisiologia della cellula e dell'organo a cui essa appartiene. Dati ottenuti con la distruzione (knockout) dei geni indicano che non è sempre vero. La distruzione di alcuni geni che esprimono proteine in alta concentrazione non causa alterazioni nella fisiologia cellulare, mentre la causano in tipi di cellule in cui sono espressi in minor grado. Un altro esempio sono le proteine che svolgono funzioni diverse, apparentemente non collegate, una nel citoplasma e l'altra nel nucleo della stessa cellula. Quindi, appare molto importante la conoscenza delle tecnologie per poter valutare il significato dei risultati sperimentali, e in particolare di quelli che non sono in accordo con altri acquisiti con tecnologie diverse. Nella seconda parte di queste dispense sono indicate schematicamente le tecnologie di base per isolare i geni e per individuare la loro posizione subcromosomica, nonché le tecnologie per identificare la funzione dei geni nella fisiologia della cellula, degli organi e dell'intero organismo. Per comprendere l'importanza delle moderne biotecnologie può essere utile fare una similitudine tra la costruzione delle mappe fisiche del genoma umano e la costruzione delle mappe nautiche dei navigatori/esploratori europei del 1500-1600 in rotta verso le Americhe. Essi, non avendo carte nautiche precise o non avendole affatto, prendevano nota del percorso fatto (orientamento, giorni di navigazione e isole note incrociate) per indicare il punto di costa ignota raggiunto, che descrivevano nel dettaglio per poterlo poi individuare in successivi viaggi. Solo una accurata ripetizione della navigazione secondo le note del precedente viaggio dava la speranza di poter arrivare nello stesso posto. Così, nella biologia molecolare è utile conoscere le tecnologie usate (percorso fatto) per capire il giusto significato del risultato ottenuto.

La costruzione della mappa fisica del genoma umano ha stabilito la posizione fisica dei geni umani su il DNA dei cromosomi, pertanto per conoscere il locus di un gene non occorre più fare esperimenti. Basterà consultare la mappa fisica nelle banche dati.

L'isolamento dei geni, la definizione della loro funzione e la loro manipolazione hanno fatto sorgere problemi etici, e altri ne sorgeranno con il progredire della ricerca. Esiste, ad esempio, il problema della segretezza delle informazioni genetiche: con l'accumularsi nelle banche elettroniche di dati sui geni umani e sulle loro mutazioni, e in particolare sui geni coinvolti nei caratteri poligenici normali e patologici, l'analisi del DNA permetterà di conoscere la costituzione genetica di un individuo e di rivelare dati molto intimi che è opportuno rimangano riservati, e che magari il paziente stesso preferirebbe non conoscere. Ad esempio, durante l'accertamento pre- o post-natale per la ricerca di determinate patologie, si riscontra con una frequenza tra il 5 e il 10% che il padre anagrafico non è il padre naturale del nascituro.

Sempre J. Watson, dopo aver accennato che ci sono opinioni diverse sul fatto se sia o meno corretto intervenire per impedire la nascita di bambini geneticamente menomati, scrive: "Alcuni si oppongono per motivi religiosi, altri perché ricordano le pratiche di eugenetica messe in atto in Germania ed egualmente hanno una forte ripugnanza per le decisioni sulla riproduzione basate sulla genetica. Queste persone temono la messa in atto di una pratica eugenetica così potente da rimpiazzare i pregiudizi razziali e di classe dei primi eugenisti con dimostrazioni

scientifiche di disuguaglianze genetiche (tra razze e classi). Ma la possibilità di controllare il destino genetico dei nostri bambini mi colpisce solo come cosa buona. E' grossolanamente spiacevole che la vita di alcune famiglie sia dominata dall'orrore di malattie genetiche. Come biologo, so che le persone sofferenti per una malattia genetica sono le vittime di uno sfortunato lancio dei dadi genetici. Le mutazioni sono state e saranno sempre un fatto essenziale della vita, poiché è a causa degli errori durante la replicazione dei geni che sorgono le varianti genetiche positive che sono la linfa vitale dell'evoluzione. Se i processi di ricopiatura dei geni fossero perfetti, la vita così come esiste ora non sarebbe mai potuta avvenire. Le malattie genetiche sono il prezzo che paghiamo per lo straordinario processo evolutivo che ha fatto sorgere le meraviglie della vita sulla Terra. Così, in ogni caso, non vedo le malattie genetiche come espressione della complessa volontà di una qualsiasi autorità soprannaturale, ma piuttosto come tragedie casuali, e noi dovremmo fare ogni cosa che è in nostro potere per evitarle" (tradotto da TIME, Special Issue Winter 1997/98).

La terapia genica è accettata con gli stessi principi con cui si operano i trapianti di organi, mentre è controverso se essa debba essere applicata anche alla linea germinale. Le modificazioni della linea germinale infatti, oltre a coinvolgere chi chiede la terapia, coinvolge anche i possibili discendenti. Non appare plausibile cercare di migliorare il genoma di un individuo mediante l'aggiunta di geni "migliori". Per ora, la terapia genica appare giustificata solo per curare malattie genetiche gravi. In favore di questa limitazione c'è anche la constatazione che le leggi di Mendel regolano solo i caratteri normali e patologici espressi da singoli geni, mentre molti caratteri normali e patologici sono poligenici e non seguono le leggi di Mendel. A complicare ulteriormente la moderna biologia, ci sono dati recenti indicanti che una proteina può avere attività biologiche molto diverse all'interno di una stessa cellula. Quindi, fino a quando non saranno perfettamente note le singole componenti dei caratteri multigenici e le proteine con più di una funzione, bisogna tener presente il fatto che il possibile inserimento di un nuovo gene in un organismo può causare squilibri che possono vanificare la cura causando altri problemi al paziente.

Le tecnologie della biologia molecolare hanno anche cambiato notevolmente il modo di fare ricerca in biochimica. Un ampio settore della ricerca biochimica era costituito dalla ricerca di nuove attività enzimatiche, dal loro dosaggio e dalla purificazione delle relative proteine enzimatiche. Il ricercatore preparava quasi tutto da sé, soluzioni, substrati anche radioattivi; la sua esperienza nella purificazione di una data proteina era unica, nel senso che le tecnologie che aveva messo a punto per la purificazione spesso non erano sempre applicabili ad altre proteine. La capacità manuale (quasi artistica) di ripetere le tecnologie, di evitare la denaturazione della proteina, apparivano molto legate all'individuo che le aveva per primo esplorate. Ciò rendeva il ricercatore più sereno, perché era difficile che il suo lavoro fosse superato da ricercatori con limitata esperienza nel campo o esperti in altri campi di ricerca. Talvolta il suo lavoro era solitario o svolto con pochi collaboratori.

Ai suoi inizi, insomma, la biologia molecolare aveva carattere artigianale simile a quello della biochimica degli anni '60. Attualmente invece, per la ricerca in

biologia molecolare moltissime soluzioni non si preparano più, si comprano già pronte, tecnologie lunghe e complicate sono diventate kit per one-step purification, 5-minutes determination, molte tecnologie complesse una volta manuali ora sono eseguite da macchine automatiche, ecc. La stabilità del DNA rende inutili tutte le precauzioni dettate dalla sensibilità del biochimico delle proteine. Le tecnologie utilizzate per clonare o caratterizzare un gene possono essere applicate, in genere con poche modifiche, ad altri geni. Le capacità di base che un ricercatore doveva avere in biochimica sono diventate meno importanti perché in gran parte soppiantate dal tutto-già-pronto standardizzato, stabile, purissimo (e spesso anche molto costoso). Gran parte dello sforzo intellettuale del biologo molecolare sta nel disegnare gli esperimenti per manipolare (tagliare, rilegare, scegliere i giusti vettori, ecc.) il DNA che intende studiare, piuttosto che nel ricercare un nuovo approccio chimico delle tecnologie che vuole utilizzare. In particolare, egli deve saper trovare la strada migliore (più rapida) per individuare/isolare “la sequenza che gli interessa” da un insieme molto eterogeneo, cioè passare dal molteplice e complesso all’unico (il classico ago nel pagliaio). Poi deve “andare dove ti porta il clone”, come suggeriscono alcuni ingegneri molecolari, cioè svolgere l’analisi funzionale del gene, che darà sicuramente risultati interessanti. Dato il carattere multidisciplinare della biologia molecolare, i risultati scientifici importanti sono quasi sempre ottenuti da grossi gruppi di ricerca, mentre si osserva sempre più la scomparsa di ricercatori solitari e di piccoli gruppi. I cavalieri solitari forse non esistono più, gli eserciti oggi sono numerosi e sempre schierati e il romanticismo nella ricerca biologica appare molto ridotto. Altra innovazione della biologia molecolare è l’incremento di risultati scientifici notevoli ottenuti per serendipità, cioè trovati per caso nel corso di una ricerca diretta verso finalità diverse.

I ricercatori in biologia molecolare possono essere divisi in almeno tre gruppi. Quelli straordinari, che per risolvere i propri problemi di ricerca hanno messo a punto tecnologie veramente innovative (es. l’utilizzo degli enzimi di restrizione e della ligasi per ricombinare il DNA, la definizione delle sequenze nucleotidiche, PCR, microarray, ecc.). Quelli che hanno saputo utilizzare e combinare in maniera innovativa le nuove tecnologie per risolvere problemi biologici fondamentali, migliorando la conoscenza fino ad aprire nuovi campi di ricerca (es. scoperta e isolamento degli oncogeni, clonazione posizionale, costruzione delle mappe fisiche, ecc.). Infine, quelli che utilizzano le nuove tecnologie e conoscenze per campi limitati di ricerca.

D.E. Koshland Jr. ha scritto che “la scienza ha una via per fornire lavoro ai suoi leali servitori”, aggiungo io “di tutti i livelli”.

Franco Gabrielli

Morfologia

Teoria cellulare (1839)

Esseri viventi solo da cellule (1850)

Trasmissione dell'ereditarietà da uova e spermatozoi (1860)

Nucleo responsabile dell'ereditarietà (1868)

Prima osservazione dei cromosomi (1877)

Cromosomi portatori dell'ereditarietà (1903)

Teoria cromosomica dell'ereditarietà (1920)
(i cromosomi sono costanti in numero e forma in ogni specie ed alla meiosi segregano in accordo con le leggi di Mendel)(dal 1930)
Identificazione di organi subcellulari con il microscopio ottico

Nota.
Le frecce indicano risultati scientifici che interessano più di una disciplina.

Genetica

Teoria dell'evoluzione (1859)

Leggi di Mendel (1865) e riscoperta (1900)

Prima ipotesi di malattia genetica causata da alterazione di un enzima (1902)

Prima mappatura di un gene sul cromosoma (X) (1911)

I geni sono associati in tanti gruppi quanti sono i cromosomi e secondo sequenze ordinate ma con frequenze di associazione diverse (1911)

Trasformazione *in vitro* di batteri con batteri uccisi al calore (1928)

Elementi genetici mobili (1935)

Concetto di polimorfismo (1940)

Dimostrazione della relazione tra attività genica e funzione biochimica (1935)

in *Drosophila* (1935)in *Neurospora* (1944)in *E. coli* (1945)Ricombinazione genica in *E. coli* (1944)Funzione del DNA (trasformazione *in vitro* di batteri con DNA) (1944)

Prima dimostrazione di una malattia autosomica recessiva da alterazione di un enzima (1948)

Il DNA è responsabile dell'infezione virale (1952)

Definizione della struttura del DNA (1953) (è considerato l'inizio della biologia molecolare)

Biochimica

Sintesi urea (1828)

Presenza di catalizzatori nelle cellule (inizi 1800)

Identificazione delle proteine (1838) dei carboidrati e lipidi (circa 1850)

Identificazione degli acidi nucleici (1871)

Estratti di cellule di lievito capaci di fermentare lo zucchero (Gli enzimi possono funzionare in assenza delle strutture cellulari) (1897)

(da circa il 1910 fino agli anni '60)

Purificazione e definizione della funzione delle proteine, vitamine, ormoni, recettori degli ormoni.

Definizione delle vie metaboliche, della sintesi del ATP e della funzione del ATP.

Separazione degli organelli subcellulari (nuclei, mitocondri, ecc.) e definizione delle loro attività biochimiche (dal 1950)

Struttura primaria (sequenza aminoacidica) dell'insulina (1953)

Morfologia

Microscopia elettronica: definizione delle strutture subcellulari (molte comuni a tutte le cellule) (dal 1945 in poi)

Anatomia cellulare a livello molecolare: morfologia delle macromolecole e delle strutture sopramolecolari
Anatomia molecolare: forma e funzione di parti delle macromolecole (geni, proteine). Analizzata mediante mutazioni sito-specifiche.

Note.
L'uso del microscopio elettronico è fondamentale per analizzare: la struttura di macromolecole sintetiche e quella di strutture macromolecolari ricostruite per confrontarle con quelle di macromolecole naturali;

Microscopia a fluorescenza.

Sostanze fluorescenti covalentemente legate ad anticorpi specifici per una proteina permettono di stabilire la posizione subcellulare della proteina e di acidi nucleici (anni '70)

-RFLP=
Restriction Fragment
Length Polymorphism
-VNRT=
Variable-number of
Tandem Repeat
(polymorphism)
-YAC= Yeast Artificial
Chromosomes

Genetica

Definizione della struttura del DNA (1953)

Prima dimostrazione di una malattia recessiva (anemia delle cellule falciformi) causata da una proteina mutata (1959)

Prima individuazione di una malattia cromosomica (trisomia di Down) (1959)

Definizione del codice genetico e della funzione del mRNA, tRNA, rRNA. Sviluppo delle culture cellulari animali e della virologia animale (anni '60)

I prodotti proteici di alcuni geni controllano altri geni (1961)

Definizione della sequenza nucleotidica del tRNA-alanina (1964)

Genetica delle cellule somatiche ed assegnazione di un gene ad un autosoma (1967)

Prima sintesi di un gene (tRNA) (1970)

Scoperta degli enzimi di restrizione (1970)

Prima ricombinazione genica *in vitro* e clonazione di un gene (1973)

Sviluppo delle tecniche per sequenziare il DNA e prime sequenze di cromosomi virali (1975-77)

Geni strutturali discontinui (esoni ed introni) (1977)

Prima proteina sintetizzata *in vitro* da un gene isolato (1977)

Ribozimi (anni 1980)

Impronta genetica mediante analisi di VNTR (1985)

Prima Clonazione di posizione (1986)

Mappatura dei cromosomi umani con RFLP (1987)

Terapia genica (1990)

Mappe fisiche del genoma umano e repertorio dei geni umani espressi (1995)

Biochimica

Prima definizione della struttura primaria (sequenza aminoacidica) di una proteina (insulina) (1953)

Definizione della struttura tridimensionale di una proteina (Mb) (1959)

Autoassemblaggio delle proteine (1961)

Allosterismo, cooperatività e riconoscimento molecolare (1965)

Note.

-Le date si riferiscono alla pubblicazione più importante (indicate da autori di review storiche).

-La biochimica solo apparentemente termina con gli anni '60. Essa è continuata come microbiologia chimica (piccoli volumi/quantità) ed è parte integrante della genetica inversa. Con la realizzazione del progetto genoma umano (determinazione della sequenza di tutti i geni), la biochimica intesa come studio (purificazione, analisi della funzione e della struttura tridimensionale) delle proteine, ha lo scopo importante di definire la funzione dei geni.

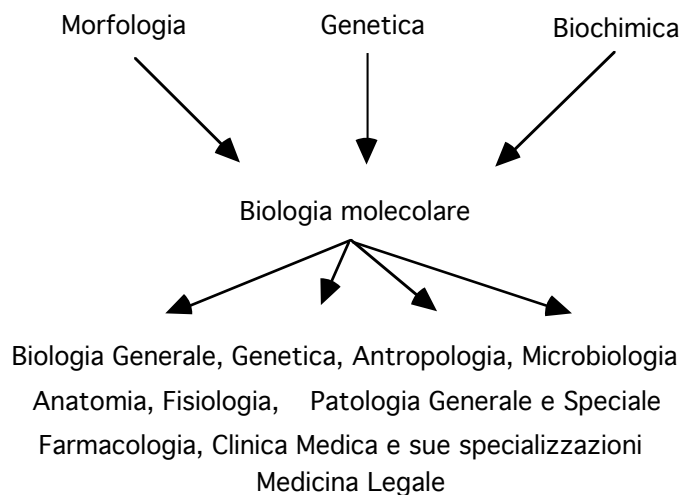
-Lo studio della struttura tridimensionale delle proteine, combinato con l'analisi delle mutazioni sito-specifiche delle proteine ha un ruolo fondamentale nel definire le funzioni dei domini delle proteine, in particolare di proteine di regolazione come ormoni, fattori di crescita, recettori ormonali, ecc...

La ricerca di tradizione europea indaga per capire la natura delle cose, mentre la ricerca di tradizione nordamericana indaga per capire come esse funzionano. La ricerca in biologia molecolare e la conoscenza che da essa deriva risultano dalla fusione dei due tipi di approccio scientifico, perché la ricerca del “come funzionano le macromolecole” (attività molecolare) implica la conoscenza del “cosa sono le macromolecole” (natura della struttura delle macromolecole) e viceversa. Capire il funzionamento delle macromolecole ha spesso una ricaduta economica (vendita di brevetti e loro sfruttamento commerciale); ciò ha fortemente condizionato la ricerca in biologia molecolare, che è diventata più competitiva e ha conosciuto un più rapido sviluppo, ma allo stesso tempo ha perso molto dell’aspetto etico e romantico che ha, o dovrebbe avere, la ricerca di base.

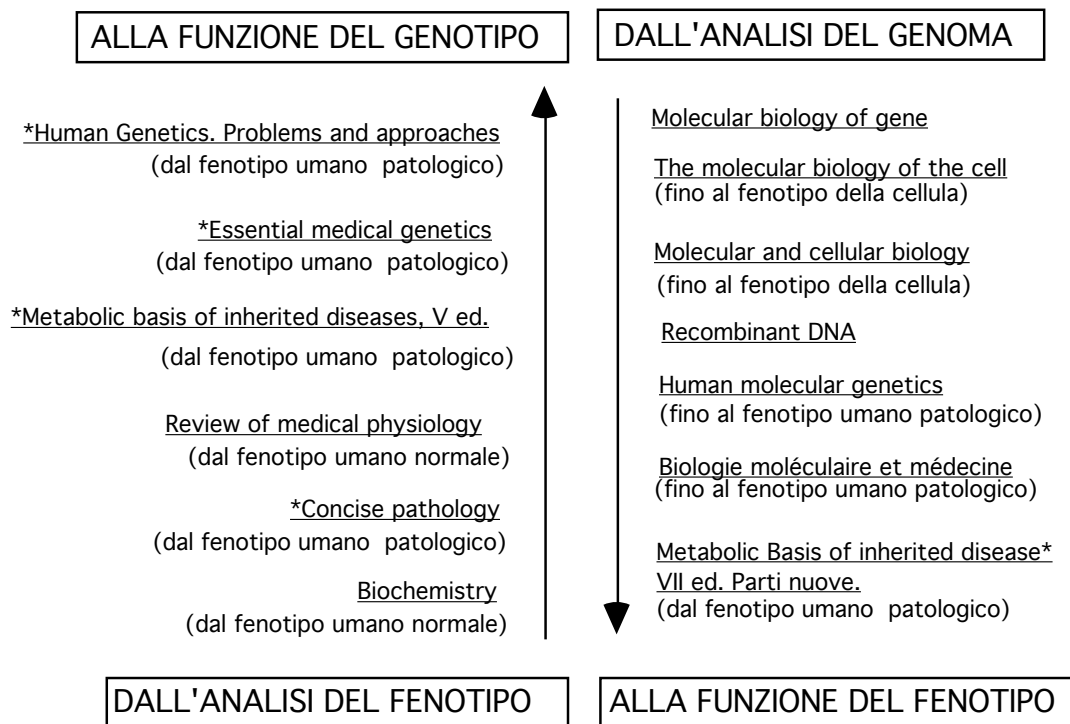
Alcune considerazioni sulla didattica della biologia molecolare

Lo schema cronologico qui sotto mostra le storie parallele delle tre discipline, morfologia, genetica e biochimica, e quella della loro progressiva integrazione fino agli anni '70 quando, con il perfezionamento delle tecnologie del DNA ricombinante e del “sequenziamento” di grandi molecole di DNA, esse sono divenute un’unica disciplina: la biologia molecolare. Di conseguenza, sono divenute molecolari altre discipline (animali e vegetali) come la biologia generale, l’evoluzionistica, la genetica, la microbiologia, la virologia, l’immunologia, l’antropologia, la fisiologia, la patologia generale e speciale, la farmacologia, la clinica medica e le sue specializzazioni, la medicina legale, la riproduzione animale e vegetale.

Tutti gli esseri viventi sono costituiti da molecole e la biologia molecolare, avendo lo scopo di spiegare in termini molecolari tutti i fenomeni biologici, inclusi quelli patologici, ha portato a unificare discipline che erano nate separate o erano state separate sulla base del soggetto biologico e patologico studiato, o della specializzazione didattica e professionale. L’analisi del DNA, arrivando ad analizzare il programma di costituzione dell’essere vivente, ne svela tutti gli aspetti: origini e parentele (genitori, avi, razza), normalità genetica e alterazioni patologiche, sensibilità a inquinanti e farmaci. Da tutto ciò l’unione delle discipline.



Le discipline sopra indicate hanno mantenuto il proprio nome, al quale spesso viene aggiunto il termine “molecolare” per distinguerle dalle stesse in versione tradizionale, nate dall’analisi del fenotipo. La biochimica è sempre stata una disciplina molecolare, e correntemente il suo nome è usato per indicare genericamente lo studio molecolare del fenotipo. Con biologia molecolare si intende lo studio strutturale dei geni, la regolazione dell’espressione genica e l’analisi/manipolazione del genoma.

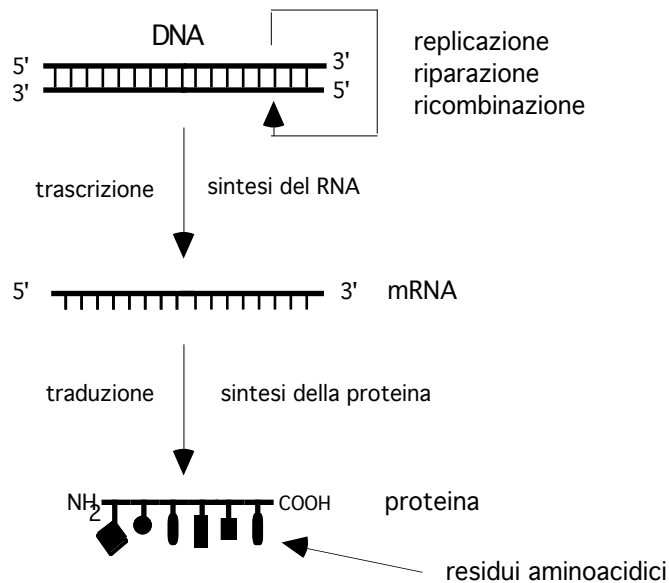


Lo schema qui sopra vuole mostrare l’impostazione didattica dei testi di biologia molecolare in contrapposizione a quelli delle discipline che studiano il fenotipo. Queste impostazioni derivano rispettivamente dallo studio del genoma e del fenotipo. L’interpretazione dei dati ottenuti dall’analisi accurata del fenotipo permette di ipotizzare la presenza dei geni e di fare esperimenti verificabili con l’analisi del fenotipo. L’utilizzazione delle tecniche di manipolazione del gene ha permesso di migliorare notevolmente la conoscenza dei meccanismi di espressione genica e quindi la conoscenza del fenotipo, risolvendo problemi difficilmente solubili con l’analisi del solo fenotipo. Da queste due diverse impostazioni tecnico-scientifiche origina la diversa impostazione didattica dei testi, indicata dal verso delle due frecce.

* Libri non tradotti in italiano

Alcune considerazioni sulla propedeutica allo studio della biochimica, biologia cellulare e biologia molecolare

Le proteine costituiscono la quasi totalità della massa secca della cellula. Esse hanno una struttura tridimensionale non rigida, per cui con la loro superficie possono reagire chimicamente e operare anche movimenti meccanici. Questa doppia natura permette alle proteine di intervenire in tutti i processi dinamici che avvengono nelle cellule. Occorre capire il loro funzionamento per poter capire come funzionano le cellule e, se non si capisce che le proteine agiscono anche come congegni meccanici, non si può capire la biologia cellulare e molecolare.



La cellula conserva la sua struttura ordinata e le sue funzioni utilizzando l'informazione contenuta nel DNA. Questa informazione viene espressa, mantenuta e replicata mediante i processi genetici di base: replicazione del DNA, riparazione del DNA, ricombinazione genetica, sintesi del RNA e delle proteine. La conversione dell'informazione genetica contenuta nella sequenza nucleotidica del DNA è trascritta nella sequenza nucleotidica del RNA, ed è poi tradotta in una sequenza di aminoacidi secondo un codice in cui a ogni tripletta di basi corrisponde un aminoacido. Tre triplette sono i segnali di stop per la sintesi proteica (figura ridisegnata e modificata e concetti tratti, parzialmente modificati, da Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D., *Molecular Biology of the Cell* (1994), 3rd ed., Garland, New York).

Quanto detto sopra puntualizza gli aspetti della genetica molecolare. La genetica è la parte della biologia che studia i meccanismi di trasmissione dei caratteri ereditari da una generazione all'altra. La genetica classica per studiare i caratteri ereditari analizzava morfologicamente, funzionalmente e chimicamente il fenotipo.

Con l'avvento delle tecnologie degli acidi nucleici i geni sono studiati come molecole (analisi della sequenza), fisicamente (localizzazione del gene su mappe fisiche dei cromosomi), è studiata la replicazione, conservazione e ricombinazione (analisi del DNA) e l'espressione (sintesi del RNA e proteine). Tutte queste caratteristiche del gene e le relative tecnologie molecolari per analizzarle sono diventate parte della genetica. In passato la sintesi e riparazione del DNA, la sintesi del RNA e delle proteine, anche se utilizzate per studi di genetica, non erano considerate "processi genetici di base".

Considerazioni su alcuni testi di chimica, biochimica e biologia molecolare

Quelle che seguono sono considerazioni personali, legate alla storia dei miei studi da studente, insegnante e ricercatore, piuttosto che a una analisi comparativa di alcuni testi di chimica, biochimica, biologia molecolare e genetica. Hanno lo scopo di indicare le mie maggiori fonti di consultazione nel tempo.

Una rivoluzione nel mio studio della chimica generale è stata portata da due libri di Linus Pauling (due volte premio Nobel: chimica e pace): "The nature of the chemical bond" (Cornell University Press, 1a ed. 1939) e "General chemistry", (Freeman, 1a ed. 1947). Non più una sequenza di dati apparentemente non collegati, ma un insieme di informazioni coese da un'unica logica, con una chiarezza e una semplicità esemplari.

Un altro libro di chimica generale straordinario per chiarezza e semplicità è "Chemical Principles" di R.E. Dickerson, H.B. Gray e G.P. Haight Jr. (Benjamin, 1a ed. 1970), ove è esposta quella che io chiamerei la "chimica del buon senso". E' un libro affascinante: introduce i vari argomenti di chimica (in genere considerata scienza fredda) iniziando da cenni storici che illuminano il percorso fatto dalla scienza, e accennando agli aspetti umani delle scoperte; così si apprende come i fondamenti della chimica traggano origine dal buon senso di chi ha saputo osservarli.

Tutte le scienze naturali nascono da un catalogo di dati, per cui i primi testi di biochimica erano simili a quelli di chimica ante-Pauling, un elenco di dati non sempre collegati.

Negli anni '60 uscì la 1a edizione del "Biochemistry" di A.L. Lehninger (Worth) e portò una nuova rivoluzione: molti tasselli del puzzle di formule, attività enzimatiche, metaboliti venivano per la prima volta collegati nella logica funzionale del metabolismo e delle integrazioni metaboliche tra i vari tessuti dell'organismo. La chiarezza del testo era aumentata dall'uso sistematico di figure piacevoli e altamente esplicative, dai titoli dei capitoli e dei paragrafi che erano vere e proprie introduzioni all'argomento che seguiva, da sommari posti alla fine dei capitoli, da problemi con risposte per una autovalutazione e, per la prima volta in un libro di biochimica, da una estesa parte sulla sintesi delle macromolecole, DNA e proteine. Queste novità sono state poi adottate in altri testi pubblicati successivamente.

Un altro bel libro di biochimica è "Biochemistry" di L. Stryer (Benjamin, 1a ed. 1975), con un approccio più mirato alla struttura e funzione delle macromolecole rispetto al libro di Lehninger, che invece è più orientato verso il metabolismo.

Nel 1965 James D. Watson (premio Nobel per la medicina) pubblicò “Molecular Biology of the Gene”, credo il primo libro di biologia molecolare. L'autore, con chiarezza e semplicità straordinarie, iniziando con la descrizione delle interazioni deboli coinvolte in tutti i riconoscimenti molecolari e nella stabilizzazione delle strutture macromolecolari, poneva le basi per la conoscenza dell'espressione genica e della sua regolazione. Alla 1a edizione seguirono una 2a, una 3a e infine una 4a con un numero di pagine triplicato perché includeva i geni eucariotici. Nella prefazione alla 4a edizione (Benjamin, 1976) Watson scrisse che “oggi nessun biologo molecolare conosce tutti i fatti importanti del gene”, e attribuì ciò alla grande messe di dati raccolti con la scoperta delle nuove tecnologie (gli autori della 3a e della 4a edizione sono cinque). Quando lessi queste parole rimasi sorpreso dalla modestia di Watson, ma fui anche confortato perché nemmeno io riuscivo più a seguire la globalità dei risultati scientifici nel mio piccolo campo di ricerca molecolare. Watson ha scritto anche “The double Helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA” (uscito nel 1968), dove racconta come lui e F. Crick definirono la struttura del DNA (lavoro per il quale ambedue hanno ricevuto il premio Nobel, insieme con M. Wilkins). Leggendo questo libro, sembra che il suo contributo alla scoperta sia stato relativo, frutto in larga parte della fortuna e dell'utilizzo di dati ottenuti da colleghi. Così, pensai ingenuamente che Watson fosse stato fortunato a ricevere il premio Nobel. Leggendo poi “Molecular Biology of the Gene” mi resi conto invece di come egli conoscesse profondamente la materia, della sua lucidità intellettuale e di come le sue spiegazioni e ipotesi così sicure, chiare e semplici originassero da una mente straordinaria.

Intorno al 1983 Watson, insieme con B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff e K. Roberts, scrisse un altro meraviglioso libro, “Molecular Biology of the Cell”, ora alla 3a edizione (Garland), dove sono descritti con semplicità e chiarezza i passaggi molecolari responsabili delle strutture e delle funzioni cellulari. E' la continuazione naturale di “Molecular Biology of the Gene” (dal 1976 non era uscita una nuova edizione). Nella prefazione alla 2a edizione di “Molecular Biology of the Cell” (1989) sono riportate le parole di E.B. Wilson: “La chiave di ogni problema biologico alla fine deve essere cercata nella cellula”.

Il progresso portato dalle moderne tecnologie del DNA ricombinante ha permesso di definire non solo molti aspetti molecolari dell'espressione genica dal gene alla proteina, ma anche fenomeni funzionali molto complessi come endocitosi, chemiotassi, movimento e adesione cellulare. Questi argomenti, dicono gli autori, “erano considerati troppo cellulari per la biochimica e troppo molecolari per gli istologi”. La biologia molecolare della cellula è ora una disciplina ben definita e, di nuovo secondo gli autori, “ha raggiunto il suo giusto posto al centro dell'insegnamento nei corsi di biologia e di medicina”.

Nel 2004 Watson e altri hanno pubblicato la 5a edizione di “Molecular Biology of the Gene” (Benjamin Cummings).

“Molecular Cell Biology”, di J. Darnell, H. Lodish e D. Baltimore (Scientific American Books, 1a edizione 1986) è un ottimo libro che, rispetto a “Molecular Biology of the Cell”, fornisce più dettagli tecnici e quantitativi, più vicini alla

sperimentazione, spesso utili per comprendere parti non dettagliatamente definite in altri testi.

Nel 1983, Watson, J. Tooze e D.T. Kurtz hanno scritto un nuovo libro, "Recombinant DNA"; nel 1992 è uscita la 2a edizione a opera di J.D. Watson, M. Gilman, J.A. Witkowski e M. Zoller (Scientific American Books). Il testo è eccezionale e ha tutte le caratteristiche watsoniane: semplice, chiaro, con ogni particolare ben collocato nel contesto generale, sempre con una spiegazione logica di ciò che propone. Il testo affronta un argomento nuovo: teoria, razionalità, modalità di esecuzione e finalità delle tecnologie del DNA ricombinante. Attraverso l'analisi dettagliata dell'applicazione di queste tecnologie, gli autori danno una nuova visione del genotipo e del fenotipo. La modalità di spiegazione della biologia molecolare mediante la descrizione dell'applicazione delle tecnologie utilizzate per osservare i fenomeni biologici è stata poi seguita da altri autori di testi di biologia molecolare.

Per eseguire la sperimentazione in biologia molecolare esiste un testo, chiamato comunemente "il Maniatis" dal cognome dell'autore, "Molecular cloning. A laboratory manual", di J. Sambrook, E. Fritsch e T. Maniatis, (2a ed., 1989, CSHL Press). E' un manuale in cui sono descritte le tecnologie di base per analizzare/manipolare gli acidi nucleici. La descrizione delle tecniche è chiara, e basta seguirla per ottenere i risultati desiderati.

Schematicamente:

Problema sperimentale ---> Recombinant DNA ---> Maniatis ---> Risultati

"Biologie Moléculaire et Médecine" di J.C. Kaplan e M. Delpech (12a ed., 1993, Flammarion) e "Human Molecular Genetics" di T. Strachan e A.P. Read, (1996, Bios) sono due libri molto interessanti, non solo perché trattano tutti gli aspetti della genetica molecolare umana (struttura, alterazioni, mappatura del genoma umano, patologie molecolari genetiche, malattie geneticamente complesse, progetto genoma e terapia genica e relative tecnologie), ma soprattutto perché la constatazione del fenotipo alterato risulta dall'analisi del genoma. Sono anche didatticamente molto utili per gli argomenti ben dettagliati e riassunti in schemi, tabelle e figure. Il primo è più vicino agli aspetti medici della genetica, il secondo agli aspetti genetico-molecolari e presenta dati e terminologie più recenti. Ambedue sono tradotti in italiano.

"Human Genetics. Problems and Approaches" di F. Vogel e A.G. Motulsky (3a edizione, 1997, Springer) è un testo di alta cultura genetica classica umana. Un testo più breve del precedente, ma completo di genetica classica orientata verso la definizione delle patologie genetiche umane, è "Essential Medical Genetics" di J.M. Connor e M.A. Fergusson-Smith (3a ed., 1991, Blackwell).

Le malattie genetiche umane sono catalogate in un eccezionale libro, "The Metabolic Basis of Inherited Disease", di J.B. Stambury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein e M.S. Brown (la 1a edizione uscì nel 1960). Fino alla 5a edizione (1983, McGraw-Hill) includeva le malattie genetiche studiate mediante l'analisi del fenotipo e la genetica tradizionale. La 6a e la 7a edizione

(che sono opera di altri autori: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly e D. Valle) includono patologie genetiche studiate mediante analisi del genoma. Il libro è notevolmente aumentato nel numero di pagine, data la grande messe di risultati portati dalle tecnologie del DNA nella genetica delle patologie umane.

Per materie vicine alla biochimica e biologia molecolare medica, come fisiologia e patologia umana, ho utilizzato due libri scritti chiaramente e semplicemente: "Review of Medical Physiology" (W.F. Ganong, Lange) e "Concise Pathology" (P. Chandrasoma e C.R. Taylor, Lange).